

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

DIALOG(R)File 347:JAPIO  
(c) 1999 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

05115381

METHOD FOR TREATING CHLORINATED ETHYLENE BY MICROBIOLOGICAL METHOD

PUB. NO.: 08-070881 [J P 8070881 A]  
PUBLISHED: March 19, 1996 (19960319)  
INVENTOR(s): SAEKI HISAFUMI  
MIURA AKIRA  
APPLICANT(s): JAPAN ENERGY CORP [330259] (A Japanese Company or  
Corporation), JP (Japan)  
APPL. NO.: 07-191043 [JP 95191043]  
FILED: July 05, 1995 (19950705)  
INTL CLASS: [6] C12P-017/02; C02F-003/34; C12N-015/09; C12P-017/02;  
C12R-001/365; C12N-015/09; C12R-001/365  
JAPIO CLASS: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 28.1  
(SANITATION -- Sanitary Equipment); 32.2 (POLLUTION CONTROL  
-- Waste Water Treatment)  
JAPIO KEYWORD:R127 (CHEMISTRY -- Fixed Enzymes)

ABSTRACT

PURPOSE: To efficiently treat a mono to tri-chlorinated ethylene by a  
microbiological oxidation method.

CONSTITUTION: A microorganism having an alkene monooxygenase enzyme-  
producing ability or a microorganism capable of being grown in a medium  
containing only an alkene as a carbon source is grown in a culture medium  
containing a mono to tri-chlorinated ethylene, thus microbiologically  
oxidizing the mono to tri-chlorinated ethylene with the microorganism to  
convert into the corresponding epoxide.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-70881

(43) 公開日 平成8年(1996)3月19日

(51) Int. CL <sup>4</sup>	識別記号	序内整理番号	P I	技術表示箇所
C 1 2 P 17/02		7432-4B		
C 0 2 F 3/34	Z A B Z			
C 1 2 N 15/09	Z N A			
		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数7 F D (全 18 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平7-191043	(71) 出願人	000231109 株式会社ジャパンエナジー 東京都港区虎ノ門二丁目10番1号
(22) 出願日	平成7年(1995)7月5日	(72) 発明者	佐伯 尚史 埼玉県戸田市新曽南三丁目17番35号 株式 会社ジャパンエナジー内
(31) 優先権主張番号	特願平6-179689	(72) 発明者	三浦 彰 埼玉県戸田市新曽南三丁目17番35号 株式 会社ジャパンエナジー内
(32) 優先日	平6(1994)7月8日	(74) 代理人	弁理士 並川 啓志
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法

(57) 【要約】

【構成】 アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物、或は、炭素源としてアルケンのみを含有する培地で生育可能な微生物を、置換する塩素数1~3の塩素置換エチレンを添加してなる培地で生育せしめ、当該微生物により置換する塩素数1~3の塩素置換エチレンを微生物学的に酸化して対応するエポキシドに転換することからなる微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【効果】 置換する塩素数1~3の塩素置換エチレンを微生物酸化により、効率良く処理することができる。

(2)

特開平8-70881

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 置換する塩素数1～3の塩素置換エチレンを添加してなる培地で、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物を生育せしめ、当該微生物を作用させて該塩素置換エチレンを微生物学的に酸化して、該塩素置換エチレンを対応するエポキシドに転換することを特徴とする微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【請求項2】 置換する塩素数1～3の塩素置換エチレンを添加してなる培地で、炭素源としてアルケンのみを含有する培地で生育可能な微生物を生育せしめ、当該微生物を作用させて該塩素置換エチレンを微生物学的に酸化して、該塩素置換エチレンを対応するエポキシドに転換することを特徴とする微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【請求項3】 前記の微生物が、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素の遺伝子DNAを含有するプラスミドベクターを導入し形質転換してなる該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物であることを特徴とする請求項1に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【請求項4】 前記の微生物が、*Nocardia* 属(ノカルディア属)、*Rhodococcus* 属(ロドコッカス属)、*Xanthobacter* 属(ザンソバクター属)及び*Mycobacterium* 属(ミコバクテリウム属)よりなる群から選択される属に分類される微生物であることを特徴とする請求項1、2又は3に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【請求項5】 前記の微生物が、*Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) であることを特徴とする請求項1、2又は4に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【請求項6】 前記のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素の遺伝子DNAが、*Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) 由来のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素の遺伝子DNAであることを特徴とする請求項3又は4に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【請求項7】 前記のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物が、*Escherichia coli* (イーコリ) に分類される形質転換微生物であることを特徴とする請求項3又は6に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、微生物学的方法により塩素置換エチレンを処理する方法に関する。特に、トリクロロエチレンなどの塩素置換エチレンを添加してなる培地で、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産

2

能を有する微生物或いは炭素源としてアルケンのみを含有する培地で生育可能な微生物を生育させ、当該微生物を作用させて塩素置換エチレンを微生物学的に酸化して分解処理する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 ハロゲン置換脂肪族炭化水素、特に、炭素数1又は2の塩素置換化合物は、油脂などの有機物をよく溶解するので洗浄用溶剤として広範に使用されてきた。例えば、塩素置換エチレンであるトリクロロエチレンは、難水溶性であり且つ揮発性が高い特質を利用して、ドライクリーニング用溶剤、電子機械工業や半導体工業での脱脂用洗浄剤として主に使用されてきた溶剤である。トリクロロエチレンは、クロロホルムと同様に中枢神経系に対し抑制作用、麻酔作用を持ち、更には突然変異(奇形)誘導性又は発癌性を有することが報告されている。その毒性故、回収処理がなされている。不幸にして排水に混入し漏洩したトリクロロエチレンは、自然界では分解され難く又難水溶性のため、土壌や地下水脈に蓄積し汚染を起こしてしまっている。これら環境汚染したトリクロロエチレンは、揚水した地下水を曝気し、大気に揮散し回収する方法、活性炭により吸着除去する方法、減圧下で土壌ガスを吸着除去する方法などの物理的な方法により回収されている。また、回収されたトリクロロエチレンは、焼却や触媒を用いた光化学的な手段で分解処理されている。

【0003】 更には、土壌に生息する嫌気性細菌の或るものは、トリクロロエチレンからより高い突然変異(奇形)誘導性又は発癌性を示す塩化ビニル(クロロエチレン)やジクロロエチレンを作ることが見い出されるに至り(E.J.Bower and P.L.McCarty, Appl. Environ. Microbiol., 45, 1286 (1983), T.M.Vogel, C.S.Cradle, and P.L.McCarty, Environ. Sci. Technol., 21, 722 (1987), Appl. Environ. Microbiol., 49, 1080 (1985)などを参照)。環境汚染したトリクロロエチレンの迅速な処理が益々必要となっている。近年、地下水脈に蓄積汚染し、広い範囲に比較的低濃度で拡散するトリクロロエチレンを処理する目的で、微生物を用いた分解除去に期待が寄せられている。

【0004】 既に、トリクロロエチレンから塩化ビニル(クロロエチレン)やジクロロエチレンを作ることがある嫌気性細菌以外に、好気性の細菌のうちにも、ハロゲン置換脂肪族炭化水素を分解する能力を有する細菌が存在することが報告されている。特に、好気性の微生物によるトリクロロエチレンの処理方法には、例えば、トルエン酸化性菌(トルエンジオキシゲナーゼ)(G.J.Zylstra, L.P.Wackett, and D.T.Gibson, Appl. Environ. Microbiol., 55, 3162 (1989)などを参照)。トルエン酸化性菌(トルエンモノオキシゲナーゼ)(R.B.Winter, K.M.Yen, and B.D.Ensley, Bio/Technol., 7, 282 (1989)などを参照)。メタン酸化性菌(メタンモノオキシゲ

(3)

特開平8-70881

3

ナーゼ) (R.Oldenhuys, R.L.J.M.Vink, D.B.Janssen, and B.Wtholt, Appl. Environ. Microbiol., 55, 2819 (1989)などを参照)、アンモニア酸化性菌(アンモニアモノオキシゲナーゼ) (T.Vannelli, M.Loan, D.M.Arciero, and A.B.Hooper, Appl. Environ. Microbiol., 56, 1169 (1990)などを参照)など、アンモニア、メタン或はメチル基を酸化する酵素を生産する微生物、即ち二重結合を含まない原子団を酸化する酵素を生産する微生物を用いて、トリクロロエチレンを処理する方法が報告されている。しかしながら、これらの水素原子をヒドロキシ基に酸化転換する酵素以外の炭化水素酸化酵素を利用するトリクロロエチレンの微生物的手法による処理方法は、これまでのところ確立されていない。特に、高い効率でトリクロロエチレンを処理するに迫る。新たなトリクロロエチレンの微生物的手法による処理方法の開発が望まれている。

【0005】加えて、トリクロロエチレンのみでなく、嫌気性細菌の作用によりトリクロロエチレンから変換される、塩化ビニル(クロロエチレン)やジクロロエチレンなどの塩素置換エチレンをも同時に処理することができる。塩素置換エチレンの微生物的手法による処理方法の開発が望まれている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、トリクロロエチレン、塩化ビニル(クロロエチレン)、ジクロロエチレンなどの塩素置換エチレンを微生物的手法による新規な処理方法を提供することである。即ち、本発明の目的は、高い効率でトリクロロエチレンなどの塩素置換エチレンを分解処理するに迫る。微生物的手法による塩素置換エチレンの新たな処理方法を提供することにある。特に、芳香族炭化水素を酸化する酵素に換えて、非芳香族の炭化水素を酸化する酵素による酸化過程を利用する、即ち非芳香族の炭化水素を酸化する酵素を生産する微生物又は非芳香族の炭化水素を質化する微生物を利用し、効率良く塩素置換エチレンを処理する方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意研究したところ、非芳香族の炭化水素であるアルケンを質化する生物活性を有する微生物により、或いはアルケンを酸化し対応するエポキシドに変換する酵素であるアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物により、トリクロロエチレンなどの塩素置換エチレンが微生物的に酸化され、トリクロロエチレンオキシドなど、対応するエポキシドに転換されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】即ち、本発明は、下記の(1)～(7)に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法である。

(1) 置換する塩素数1～3の塩素置換エチレンを添

4

加してなる培地で、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物を生育せしめ、当該微生物を作用させて該塩素置換エチレンを微生物学的に酸化して、該塩素置換エチレンを対応するエポキシドに転換することからなる微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

(2) 置換する塩素数1～3の塩素置換エチレンを添加してなる培地で、炭素源としてアルケンのみを含有する培地で生育可能な微生物を生育せしめ、当該微生物を作用させて該塩素置換エチレンを微生物学的に酸化して、該塩素置換エチレンを対応するエポキシドに転換することからなる微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

(3) 前記の微生物が、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素の遺伝子DNAを含有するプラスミドベクターを導入し形質転換してなる該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物であることを特徴とする前記

(1)に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

(4) 前記の微生物が、*Nocardia* 属(ノカルディア属)、*Rhodococcus* 属(ロドコッカス属)、*Xanthobacter* 属(ザンソバクター属)及び*Mycobacterium* 属(ミコバクテリウム属)よりなる群から選択される属に分類される微生物であることを特徴とする前記(1)～(3)の何れかに記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

(5) 前記の微生物が、*Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276株 (FERM BP-5124; ATCC 31338)であることを特徴とする前記(1)、(2)又は(4)の何れかに記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

(6) 前記のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素の遺伝子DNAが、*Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276株 (FERM BP-5124; ATCC 31338)由来のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素の遺伝子DNAであることを特徴とする前記(3)又は(4)に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

(7) 前記のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物が、*Escherichia coli* (イー コリ)に分類される形質転換微生物であることを特徴とする前記(3)又は(6)に記載する微生物学的方法による塩素置換エチレンの処理方法。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の方法で分解処理される、置換する塩素数1～3の塩素置換エチレンとは、具体的には、トリクロロエチレン、1,1-ジクロロエチレン、cis-1,2-ジクロロエチレン、trans-1,2-ジクロロエチレン、並びに塩化ビニル(クロロエチレン)をさす。また、本発明の方法により該塩素置換エチレンから転換されるエポキシドは、培地に多量に含まれる水により、

(4)

特開平8-70881

5

エポキシ環が水付加開環して対応する塩素置換エタンジオールに速やかに変換される。最終的には、該塩素置換エタンジオールは、更に代謝を受けて微生物学的な分解を受ける、或いは化学的に置換する塩素原子の水酸基への変換を受け、分解される。なお、該塩素置換エチレンから生成される対応のエポキシドが、更に酸性或はアルカリ性条件の下で、水中において化学的に分解される過程は、Biosci. Biotech. Biochem. 56(3), 486-489 (1992)などの刊行物に記載されている。

【0010】本発明において利用する微生物、即ち、炭素源としてアルケンのみを含有する培地で生育可能な微生物は、土壤中から採取し、プロピレンを唯一の炭素源として含有する培地を用いて生育させることにより、分離することができる。特に、プロピレンからプロペンオキシドを経由して分解する微生物が好適に用いることができる。具体的には、プロピレンからプロペンオキシドを生産する能力を有する微生物として、既に報告されている *Nocardia* 属 (ノカルディア属)、*Rhodococcus* 属 (ロドコッカス属)、*Xanthobacter* 属 (ザンソバクター属) 及び *Mycobacterium* 属 (ミコバクテリウム属) からなる群に分類される微生物は、プロピレンからプロペンオキシドへの酸化能が高く、好適な微生物である。これらの菌として、次の文献、C. G. van Ginkel, H. G. J. Welten and J. A. M. de Bont, Appl. Environ. Microbiol. 53, 2903 (1987) に記載される菌を例示することができる。上記する炭素源としてアルケンのみを含有する培地で生育可能であり、*Nocardia* 属 (ノカルディア属)、*Rhodococcus* 属 (ロドコッカス属)、*Xanthobacter* 属 (ザンソバクター属) 及び *Mycobacterium* 属 (ミコバクテリウム属) からなる群に分類される微生物の内、アルケン以外の炭素源、例えばグルコースを炭素源として育成した際にも、置換する塩素数1~3の塩素置換エチレンに対応するエポキシドに変換する能力の高いものは、一層好適な微生物である。

【0011】また、本発明に用いるアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物は、アルケン代謝に関わる、初期酸化酵素のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素を生産する微生物である。即ち、アルケンから対応するエポキシドに変換するアルケンモノオキシゲナーゼ酵素を生産する微生物であり、例えば、アルケンとしてプロピレンを用い、対応するエポキシドを産出する微生物として土壤中から分離することができる。好適な微生物として、*Nocardia* 属 (ノカルディア属)、*Rhodococcus* 属 (ロドコッカス属)、*Xanthobacter* 属 (ザンソバクター属) 及び *Mycobacterium* 属 (ミコバクテリウム属) からなる群に分類され、且つ末端に炭素-炭素二重結合を有するアルケンに対応するエポキシドに変換する能力を有する菌を挙げることができ、具体的には、文献、C. G. van Ginkel, H. G. J. Welten and J. A. M. de Bont, Appl. Environ. Microbiol. 53, 2903 (1987)

6

に記載される菌を例示できる。更には、*Rhodococcus* 属 (ロドコッカス属) に属する微生物のうち、好適な種として、*Rhodococcus rhodochrous* を、具体的な菌株として、American Type Culture Collection に、受託番号 ATCC 29675、ATCC 29670、ATCC 29672 をそれぞれ付与され、寄託されている菌株を例示することができる (米国特許5380654号、米国特許5376539号特許公報などを参照)。或は、*Rhodococcus* sp. ATCC 29673、*Rhodococcus* sp. ATCC 29674 などの菌株を例示することができる (米国特許5380654号、米国特許5376539号特許公報などを参照)。*Xanthobacter* 属 (ザンソバクター属) に属する菌として、*Xanthobacter* strain Py2 株など (Appl. Environ. Microbiol., 58, 3038 (1992) を参照)、*Mycobacterium* 属 (ミコバクテリウム属) に属する菌として、*Mycobacterium* strain L1 株 (Biotechnol. Lett., 7, 383-388 (1985)、或は J. Gen. Microbiol., 137, 2555-2560 (1991) を参照)、*Mycobacterium rhodochrous* NCIB 703 株 (米国特許4956284号特許公報を参照) などを例示することができる。又、天然より分離されるアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物に由来するアルケンモノオキシゲナーゼ酵素をコードする遺伝子 DNA を公知の遺伝子組み換え技術によりプラスミドに組み込んでなるプラスミドベクターを構築し、宿主微生物に導入し形質転換してなる当該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物も、該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素を生産するので好適に用いることができる。特に、アルケン以外の炭素源、例えばグルコースを炭素源として育成した際にも、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能が高く維持される微生物は、一層好適な微生物である。

【0012】更には、本発明において特に好適な菌として、本発明者らが先の特許出願 (特願 平5-105171号の明細書、即ち特開平6-292571号公報を参照) に開示する *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) を挙げる事ができる。又、当該菌株、*Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) の産生するアルケンモノオキシゲナーゼ酵素をコードする遺伝子 DNA、*amoABC* 遺伝子を大腸菌由来のプラスミドに組み込んでなるプラスミドベクターにより形質転換してなる大腸菌、即ち該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する大腸菌形質転換株、例えば、*E. coli* (大腸菌) JM109 (pDB8-1) 株 (FERM BP-4250) など、特に好適な菌として挙げる事ができる。なお、前記する微生物 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) は受託番号 FERM BP-5124 を付与され、*E. coli* (大腸菌) JM109 (pDB8-1) 株 (FERM BP-4250) は受託番号 FERM BP-4250 を付与され、ともに通産省工業

(5)

特開平8-70881

7

技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。また、微生物 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) は、American Type Culture Collection に、受託番号 ATCC 31338 を付与され、寄託されている。なお、微生物 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) は、従来、受託番号 P-4094 のもとに国内寄託されていたが、国際寄託に移管され、新たに通産省工業技術院生命工学工業技術研究所より受託番号 FERM BP-5124 を付与されている。この二種の微生物は、アルケン以外の炭素源、例えばグルコースを炭素源として育成した際にも、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能が高く維持され、従って、置換する塩素数 1~3 の塩素置換エチレンを対応するエポキシドに変換する能力が高く保たれるので、特に好適な微生物である。加えて、*Nocardia* 属 (ノカルディア属) 及び *Rhodococcus* 属 (ロドコッカス属) に属し、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する菌は、一般に、アルケン以外の炭素源、例えばグルコースを炭素源として育成した際にも、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能が

高く維持されるので、好適な微生物である。  
【0013】加えて、天然より分離されるアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物に由来するアルケンモノオキシゲナーゼ酵素をコードする遺伝子 DNA を公知の遺伝子組み換え技術によりプラスミドに組み込んでなるプラスミドベクターを構築し、宿主微生物に導入し形質転換してなる当該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物は、前記する宿主微生物が大腸菌であるものに限らず、*Nocardia* 属 (ノカルディア属) や *Rhodococcus* 属 (ロドコッカス属) などのノカル

ディフォルム細菌由来のプラスミドを利用し、外来のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素をコードする遺伝子 DNA を組み込んでなるプラスミドベクターを導入してなる、宿主微生物がノカルディフォルム細菌である該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する形質転換菌株も好適に利用できる。なお、前記するノカルディフォルム細菌或はコリネフォルム細菌由来のプラスミドとして、本発明者らが既に提案しているプラスミド pNC500 (特開 平5-244953 号公報を参照)、プラスミド pNC903 (特開 平6-73795 号 明細書を参照) などが利用できる。  
【0014】即ち、これらノカルディフォルム細菌或はコリネフォルム細菌由来のプラスミドと大腸菌由来のプラスミドから、両者の菌間でのシャトルベクタープラスミドを調製し、これにアルケンモノオキシゲナーゼ酵素をコードする遺伝子 DNA を組み込み発現ベクター (環状プラスミド) を構築する。係るアルケンモノオキシゲナーゼ酵素発現ベクターは、例えば、宿主微生物であるノカルディフォルム細菌の細胞をプロトプラスト或はスフェロプラストにして、環状プラスミドをポリエチレン

8

グリコールと共存させるなどして移入する方法 (J. Bacteriol., 170, 638-645 (1988) などを参照)、または宿主微生物の細胞を対数増殖期中期まで培養し、高電圧の電気パルスを与えて移入する方法 (Appl. Environ. Microbiol., 56, 2818-2825 (1990) などを参照) 等の公知の技術を適用し、該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する形質転換菌株を調製することができる。

【0015】上記する天然より分離されるアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物に由来するアルケンモノオキシゲナーゼ酵素をコードする遺伝子 DNA を遺伝子組み換え技術によりプラスミドに組み込んでなるプラスミドベクターを構築し、宿主微生物に導入し形質転換してなる当該アルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物を用いる場合、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素として *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) の産生するアルケンモノオキシゲナーゼ酵素が好適に用いることができる。この酵素は、アルケンに酸素を付加しエポキシドを形成するエポキシダーゼの small サブユニットと large サブユニットにそれぞれ当たる *amoA* と *amoC*、前記するエポキシダーゼに補酵素 NADH から電子を伝達するレダクターゼ (還元酵素) に当たる *amoD* 及びそれらを複合酵素系に構成するカップリングタンパク質と称される *amoB* の4つの蛋白質部分からなっている。

【0016】この *amoA*、*amoB*、*amoC* 及び *amoD* は、その遺伝子 DNA は配列番号 1 に示す *amoABCD* 遺伝子にクラスターとしてそれぞれのアミノ酸配列が連続してコードされている。なお、アミノ酸配列は配列番号 1 に示す *amoABCD* 遺伝子のコドンに対応して示されている (特開 平5-105171 号の明細書、即ち特開 平6-292571 号公報を参照)。更に、この好適な *amoABCD* 遺伝子を市販されている大腸菌由来のプラスミド pUC18 (宝酒造株式会社より購入) に組み込んでなるプラスミドベクター pD881 (図 1 を参照) は、*E. coli* (大腸菌) JM109 (pD88-1) 株 (FERM BP-4250) に保持されている。前記プラスミドベクター pD881 を宿主の大腸菌の様々な菌株に導入してなる形質転換菌株は、*E. coli* (大腸菌) JM109 (pD88-1) 株 (FERM BP-4250) と同様に好適なアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物として用いることができる。

【0017】本発明においては、炭素源としてアルケンのみを含有する培地で生育可能な微生物、或はアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物の何れかを選択し、トリクロロエチレンなど、置換する塩素数 1~3 の塩素置換エチレンを添加してなる培地で、当該微生物を生育せしめ、該微生物を作用させて該塩素置換エチレンを微生物学的に酸化して処理するに際し、該微生物の生育は通気条件又は好気条件下で行うことが好ましい。即ち、これらの微生物の産出するアルケンモノオキ

シグナーゼ酵素、或はアルケン代謝に関わる酸化酵素は、ともに通気条件又は好気条件下においてその酵素活性を高く維持することができる。

【0018】本発明における微生物の生育には、例えば、(a) 該微生物を予め培養増殖して得られる菌体を、塩素置換エチレンを添加してなる培地で好気条件下に生育する方法、(b) 該微生物を、その他の炭素源、窒素源、無機塩類、更には必要に応じて成長促進物質を含有せしめた栄養培地に塩素置換エチレンを添加してなる培地で通気条件又は好気条件下に培養生育する方法を好適に適用することができる。なお、微生物の生育は、培地の pH を pH 5~9、好ましくは pH 6~8 の範囲に、温度を 20~50℃、好ましくは 25~45℃ の範囲に保ちつつ、1~6 日間行なう。更には、生育中、当該微生物の菌体増殖に利する炭素源、窒素源、更にはその他の成分を適宜添加することにより、菌体とトリクロロエチレンなどの塩素置換エチレンとの反応の活性を維持し或いは高めることができる。

【0019】上記の(a) 該微生物を予め培養増殖する方法においては、培養増殖のための培地には、まず炭素源として糖質例えばグルコース、シュクロース、糖蜜、でん粉加水分解物、セルロース加水分解物及び、炭化水素例えばプロピレン、エチレン、ブタジエンなどの菌体増殖作用の高いものを用い、窒素源として塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素、アンモニア水、アミノ酸及びその他の資化性有機窒素化合物など、無機塩類としてリン酸カリウム、リン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸第一鉄、塩化第二鉄、塩化カルシウム、塩化マンガンなど、更には必要に応じてビタミン類、酵母エキス、コーンステイーブリカーの如き成長促進物質をも添加した培地を用いる。この培養増殖のための培地に該微生物の菌種を接種し、好気的条件下で培養して菌体を増殖させる。このようにして得られた菌体培養物に直接か、又は該培養物から分離した菌体の懸濁液もしくは菌体を固定化したものに、トリクロロエチレンなどの塩素置換エチレンを添加してなる培地を加える。

【0020】他方、上記の(b) 該微生物を、栄養培地に塩素置換エチレンを添加してなる培地で通気条件又は好気条件下に培養生育する方法においては、栄養培地として前記(a) の方法で用いる培養増殖のための培地を用いて、該微生物の菌種を接種培養する際に、トリクロロエチレンなどの塩素置換エチレンを培地に供給して酸化反応をさせる。

【0021】何れの生育方法においても、塩素置換エチレンを培地に添加する方法は、予め微生物を生育する開始時に所定量を全量を加えても良いし、生育の時間経過に従い、塩素置換エチレンを回分方式又は連続方式で適宜加えても良い。添加を回分方式にて行う際は、間歇的に供給することができる。更には、トリクロロエチレン

などの塩素置換エチレンは液体、或は水に溶解又は拡散する混合物として添加するのみでなく、該塩素置換エチレンの蒸気を含む空気を培地に吹き込むなどの手段を採り、気相より培地に添加してもよい。好ましくは、培地に添加する塩素置換エチレンは、培地中の該塩素置換エチレン濃度が 1 mM を超えない範囲に保つ量を選ぶとよい。更には、これら菌体反応は、温度 30~45℃ の範囲、特に、35℃ 付近 (35±5℃) で行うのが好ましい。

【0022】なお、上記する本発明に用いるアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物、或は炭素源としてアルケンのみを含有する培地内で生育可能な微生物は、トリクロロエチレンのみでなく、少なくとも 1 つの水素原子を有する塩素置換エチレン、更には少なくとも 1 つの水素原子を有するフッ素を除くハロゲン置換エチレンを微生物学的に酸化して分解することができる。そのため、好気条件下で当該微生物を汚染された地下水に含まれるトリクロロエチレンを処理に利用する際には、土壤に生息する嫌気性細菌がトリクロロエチレンから生成する塩化ビニル(クロロエチレン)やジクロロエチレンが存在していても、同時に処理することができる。また、塩化ビニルやジクロロエチレンのより高い毒性のため、当該微生物の死滅或は生理活性の低下が起こることもなく、長期又は連続的な汚染された地下水に含まれるトリクロロエチレンの処理に資する。

【0023】更には、本発明に利用される酵素反応又は菌体反応は、置換する塩素数 1~3 の塩素置換エチレンのみでなく、一般に、塩素、臭素又はヨウ素が 1~3 置換するハロゲン置換エチレンに対しても有効である。即ち、それらハロゲン置換エチレンを対応するエポキシドに転換することができ、微生物学的方法による該ハロゲン置換エチレンの処理方法として利用できる。以下実施例により本発明を更に具体的に説明する。

【0024】

【実施例 1】*Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) の菌体 3 白金耳を、NBC 培地 (オキシド社製ラブレコパウダー 10g、バクテリオロジカルペプトン 10g、グルコース 10g 及び塩化ナトリウム 5g に水を加え 1 l とし、1N-苛性ソーダ水溶液を加えて pH 7.5 に調整した後、オートクレーブ中で 120℃、15 分加熱殺菌した液体培地) 100 ml を入れた 500 ml 容の坂口フラスコに接種し、30℃ で 96 時間振盪し、予め菌体を培養増殖した。

【0025】この予め培養増殖により得られた培養液を遠心分離し、集菌した。次に、集菌した菌体を、50 ml の培地 ( $K_2HPO_4$  1.74g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5g,  $FeSO_4 \cdot H_2O$  0.05g, 脱イオン水 1 l, pH 8.0 に調整) に再懸濁して菌懸濁液を調製した。

【0026】フラスコに入れた前記菌懸濁液に、更に 2.5 ml の 10 % グルコース溶液とトリクロロエチレン(最



(7)

特開平8-70881

11

終濃度 1 mM) を添加し密閉後、振盪しながら 30 °C で 12 時間育成し、トリクロロエチレンと反応させた。その後、培地の一部を分取し、ガスクロマトグラフィー測定により、この培地に残留するトリクロロエチレンによるシグナル強度 ( $I_1$ ) を決定した。

【0027】他方、参照例として、同じ容量のフラスコに入れた菌体を含まない 50 ml の培地 ( $K_2HPO_4$  1.74g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5g,  $FeSO_4 \cdot H_2O$  0.05g, 脱イオン水 1 l, pH 8.0 に調製) に、2.5 ml の 10 % グルコース溶液とトリクロロエチレン (最終濃度 1 mM) を添加し密閉後、30 °C で 12 時間振盪した。この参照例の培地の一部を分取し、ガスクロマトグラフィー測定によりこの培地に残留するトリクロロエチレンによるシグナル強度 ( $I_2$ ) を決定した。この参照例のシグナル強度 ( $I_2$ ) は、当初のトリクロロエチレン (最終濃度 1 mM) を添加した培地において測定されるトリクロロエチレンのガスクロマトグラフィーのシグナル強度 ( $I_0$ ) の 9.5 % 以上であった。

【0028】前記シグナル強度 ( $I_1$ ) は、参照例のシグナル強度 ( $I_2$ ) の約 2 % であった。即ち、当該微生物を生育することで、培地に残留するトリクロロエチレンの培地濃度を約 2 % とすることができ、約 9.8 % のトリクロロエチレンが処理分解されたことが判る。なお、上記する処理において、トリクロロエチレンは、先ずトリクロロエチレンオキシドに転換されている。また、該 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) は、グルコースを炭素源として添加して予め培養し、且つグルコースを炭素源として添加して菌体反応を行わせる際にも、トリクロロエチレンの処理能力が高いことが判る。

【0029】

【実施例 2】*Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 由来のアルケンモノオキシゲナーゼ遺伝子で形質転換した *E. coli* (大腸菌) JM109 (pDB8-1) 株 (FERM-BP4250) の菌体 1 白金耳を、50  $\mu$ g/ml のアンピシリン含有 LB 培地 (バクトートリブトン 10g, バクトーイーストエキス 5 g 及び塩化ナトリウム NaCl 10g に脱イオン水を加え 1 l とし、1N-苛性ソーダ水溶液を加え pH 7.2 に調製した後、オートクレーブ中で 120 °C、15 分加熱殺菌した液体培地) 1.5 ml に接種し、37 °C で一晚 (約 14 時間) 予め菌体を培養増殖した。得られた培養物を、再度 50  $\mu$ g/ml のアンピシリン含有 LB 培地 100 ml に接種し、37 °C で 2 時間培養した。この液に最終濃度が 1 mM となるように IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) を添加し、更に 37 °C で 5 時間振盪培養した。この一連の培養により得られた培養液の 10 ml を遠心分離により菌留し、2 ml の培地 ( $K_2HPO_4$  1.74 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5g,  $FeSO_4 \cdot H_2O$  0.05g, 脱イオン水 1 l, pH 8.0 に調製) に再懸濁して菌懸濁液を調製した。

【0030】フラスコに入れた前記菌懸濁液に、100  $\mu$ l の 10 % グルコース溶液とトリクロロエチレン (最終

12

濃度 1 mM) を添加し密閉後、振盪しながら 30 °C で 12 時間、トリクロロエチレンと反応させた。その後、培地の一部を分取し、ガスクロマトグラフィー測定により、この培地に残留するトリクロロエチレンによるシグナル強度 ( $I_1$ ) を決定した。

【0031】他方、参照例として、同じ容量のフラスコに入れた菌体を含まない 2 ml の培地 ( $K_2HPO_4$  1.74g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5g,  $FeSO_4 \cdot H_2O$  0.05g, 脱イオン水 1 l, pH 8.0 に調製) に、100  $\mu$ l の 10 % グルコース溶液とトリクロロエチレン (最終濃度 1 mM) を添加し密閉後、30 °C で 12 時間振盪した。この参照例の培地の一部を分取し、ガスクロマトグラフィー測定によりこの培地に残留するトリクロロエチレンによるシグナル強度 ( $I_2$ ) を決定した。この参照のシグナル強度 ( $I_2$ ) は、当初のトリクロロエチレン (最終濃度 1 mM) を添加した培地において測定されるトリクロロエチレンのガスクロマトグラフィーのシグナル強度 ( $I_0$ ) の 9.5 % 以上であった。

【0032】前記シグナル強度 ( $I_1$ ) は、参照例のシグナル強度 ( $I_2$ ) の約 8.3 % であった。即ち、当該微生物を生育することで、培地に残留するトリクロロエチレンの培地濃度を約 8.3 % とすることができ、約 1.7 % のトリクロロエチレンが処理分解されたことが判る。なお、上記する処理においても、トリクロロエチレンは、先ずトリクロロエチレンオキシドに転換されている。また、グルコースを炭素源として添加する際にも、該 *E. coli* (大腸菌) JM109 (pDB8-1) 株 (FERM-BP4250) は、トリクロロエチレンの処理能力が高いことが判る。

【0033】

【実施例 3】*Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) によるトリクロロエチレンの微生物学的な酸化処理速度に対する、トリクロロエチレン添加濃度の影響を下記の方法で検証した。

【0034】上記の実施例 1 に記載の培養増殖法に従い、*Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124 ; ATCC 31338) を、予め菌体を培養増殖した。次に、集菌した菌体を、50 ml の培地 ( $K_2HPO_4$  1.74g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5g,  $FeSO_4 \cdot H_2O$  0.05g, 脱イオン水 1 l, pH 8.0 に調製) に再懸濁して菌懸濁液を調製した。

【0035】該菌懸濁液 2 ml を、容量 17 ml のフラスコに入れ、更に、エネルギー源として、100  $\mu$ l の 10 % グルコース溶液を加え、所定量のトリクロロエチレンを添加し密閉後、振盪しながら 35 °C で 5 時間、トリクロロエチレンと反応させた。なお、この反応時、菌濃度は、2.44 g/l であった。この間、1 時間経過ごとに、密閉されたフラスコの気相より、1 ml の気体をサンプリングし、その中に残存するトリクロロエチレン気相濃度をガスクロマトグラフィー法 (カラム: Porapak Q) により分析した。このトリクロロエチレン気相濃度

(8)

特開平8-70881

13

の測定値を基に、液相に残存するトリクロロエチレン濃度に換算を行った。

【0036】当初に添加するトリクロロエチレンの量（液相濃度初期値）を徐々に採り、該微生物を作用させた際、液相に残存するトリクロロエチレン濃度の経時変化を比較した一例を、図2に示す。また、液相のトリクロロエチレン濃度の減少率を、トリクロロエチレンの液相濃度初期値に対してプロットした結果の一例を、図3に示す。これらの結果に示されるように、該 *Nocardia corallina*（ノカルディア コラリーナ） B-276 株（FERM BP-5124 ; ATCC 31338）の処理速度は、添加するトリクロロエチレンの液相濃度初期値にほぼ比例しており、少なくともトリクロロエチレンの液相濃度初期値 90 mq/l までの範囲では、明確な阻害は見いだされていない。図3に示す結果を基に、基質トリクロロエチレンのこの酵素反応に対する  $K_m$  値を算出したところ、 $K_m = 90.4 \text{ mq/l}$  (0.678 mm) の値が得られた。

【0037】以上の結果より、当該菌 *Nocardia corallina*（ノカルディア コラリーナ） B-276 株（FERM BP-5124 ; ATCC 31338）は、高いトリクロロエチレン濃度においても、その酵素反応は阻害を受けず、高い処理能力を保つと判断される。

【0038】加えて、*Nocardia corallina*（ノカルディア コラリーナ） B-276 株（FERM BP-5124 ; ATCC 31338）によるトリクロロエチレンの微生物学的な酸化処理速度に対する、温度の影響を検証した。処理速度に換えて、菌濃度を、8.0 q/l に採り、トリクロロエチレンの液相濃度初期値を 50.1 mq/l としたとき、処理開始後60 分間経過した時点で、液相に残存するトリクロロエチレン濃度を初期値に対する比率で表記した値を、酸化処理速度の指標とした。培地温度を徐々に選び、一定温度で処理を行った結果を、処理速度（相対値）を培地温度に対してプロットした一例を、図4に示す。培地温度が35℃付近で、処理速度が極大となることが判った。即ち、30～45℃の範囲、具体的には、この35℃付近を中心前後5℃の範囲で処理することが好ましいことが判った。

【0039】

化合物	処理速度 (mq/l/h)	使用した菌濃度 (q/l)
cis-1,2-ジクロロエチレン	72.2	4.0
1,1-ジクロロエチレン	14.8	8.0
trans-1,2-ジクロロエチレン	6.5	4.0
トリクロロエチレン	5.5	4.0
テトラクロロエチレン	0	4.0
1,2-ジクロロエタン	0	4.0

【0043】この点からも、本菌体反応は、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素反応により、エポキシドに転換される過程が、その初期反応であることが確認される。更には、テトラクロロエチレン（パークロロエチレン）では酵素反応が起こらず、cis-1,2-ジクロロエチレンで酵

14

\*【実施例4】*Nocardia corallina*（ノカルディア コラリーナ） B-276 株（FERM BP-5124 ; ATCC 31338）を利用して、トリクロロエチレン以外の塩素置換エチレン、即ち、1,1-ジクロロエチレン、cis-1,2-ジクロロエチレン、trans-1,2-ジクロロエチレン、並びに塩化ビニル（クロロエチレン）に付いても、酸化処理が行えることを検証するため、下記する条件で処理を試みた。なお、テトラクロロエチレン（パークロロエチレン）と 1,2-ジクロロエタンに付いても、併せて処理を試みた。なお、菌体の培養、及び菌体反応に用いる培地の組成（基質を除く組成）等の条件は、実施例1に従った方法を用いた。

【0040】上記の各基質の添加量は、液相濃度初期値が 20 mq/l を超えない範囲、即ち何れの基質でも菌体反応に対する基質阻害が見いだされないと予測される範囲に選択した。具体的には、トリクロロエチレンの液相濃度初期値が 11.2 mq/l に相当する添加量 100 mq に選んだ。反応時の菌濃度を、4.0 q/l 又は 8.0 q/l に採り、上記の実施例3の手法に従って、気相中の各基質濃度を経時的に測定し、液相濃度に換算した結果を基に、処理速度を算出した。各基質の残余量の経時的な変化を処理時間に対してプロットし、比較した一例を、図5に示す。

【0041】算出された各基質に対する処理速度と用いた反応時間濃度を、表1に示す。該 *Nocardia corallina*（ノカルディア コラリーナ） B-276 株（FERM BP-5124 ; ATCC 31338）を利用して、トリクロロエチレン以外の塩素置換エチレン、即ち、1,1-ジクロロエチレン、cis-1,2-ジクロロエチレン、trans-1,2-ジクロロエチレンに付いても、処理が行えることが確認された。しかしながら、テトラクロロエチレン（パークロロエチレン）と 1,2-ジクロロエタンに付いては、処理が行えないことも判った。1,2-ジクロロエタンは、炭素-炭素二重結合が存在しないので、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素の反応により、エポキシドに変換され得ないものであった。

【0042】

【表1】

素反応が最も効率が高い点を考察すると、炭素-炭素二重結合に残余する水素原子が基質の酵素への付加過程に不可欠であることが判る。このことは、cis-1,2-ジクロロエチレンの処理速度が格段に高く、1,1-ジクロロエチレン(7.4 mq/l/h に相当する)、trans-1,2-ジクロロ

(9)

特開平8-70881

15

エチレン(6.5 mg/l/h)、トリクロロエチレン(5.5 mg/l/h)の順で僅かずつ減少していることにも、反映されている。更には、基質の酵素への付加過程で、炭素-炭素二重結合に一つの水素原子と一つの水素原子が同じ配向に存在する基質では、その立体選択性に本質的な差異が無いため、1,1-ジクロロエチレン、trans-1,2-ジクロロエチレン、トリクロロエチレンの間で、処理速度に顕著な差異が生じていないと理解される。更には、cis-1,2-ジクロロエチレンと同じく、シス位に二つの水素原子が残る塩化ビニル(クロロエチレン)に付いても、該酵素反応が速やかに起こると推察される。なお、塩化ビニル(クロロエチレン)は、発癌性物質であり、常温で気体であるため、上記の方法による評価は困難であるので、処理速度の確認は行わなかった。

【0044】上記の結果から、本発明の処理方法は、アルケンモノオキシゲナーゼ酵素反応により、エポキシドに転換される過程を利用していることが確認され、該 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124; ATCC 31338)のみでなく、同種のアルケンモノオキシゲナーゼ酵素を生産する微生物一般も利用できることが判る。加えて、トリクロロエチレンを処理する微生物であるならば、1,1-ジクロロエチレン、cis-1,2-ジクロロエチレン、trans-1,2-ジクロロエチレン、並びに塩化ビニル(クロロエチレン)をも処理することができる。特に、グルコースを炭素源として培養、菌体反応中に添加する際にも、該 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124; ATCC 31338)は、トリクロロエチレンのみでなく、1,1-ジクロロエチレン、cis-1,2-ジクロロエチレン、trans-1,2-ジクロロエチレン、並びに塩化ビニル(クロロエチレン)に対する処理能力が高いことが判る。

16

\* ans-1,2-ジクロロエチレン、並びに塩化ビニル(クロロエチレン)に対する処理能力が高いことが判る。

【0045】

【発明の効果】本発明の方法においては、アルケンを還元する生物活性を有する微生物により、或いはアルケンを酸化し対応するエポキシドに変換する酵素であるアルケンモノオキシゲナーゼ酵素生産能を有する微生物をトリクロロエチレンなどの置換する塩素数1~3の塩素置換エチレンを添加してなる培地で生育することにより、該塩素置換エチレンを微生物酸化して、効率良く分解処理することができる。更には、本発明の方法は、トリクロロエチレンなどの置換する塩素数1~3の塩素置換エチレンを極く低濃度に含有する汚濁水、或は蒸餾するトリクロロエチレンなどの塩素置換エチレンを含有する排気など、大量の媒体中に極く低濃度で分散する塩素置換エチレンを処理する際に、最も台目的な塩素置換エチレンの処理法として利用できる。

【配列表】配列番号: 1

配列の長さ: 6379

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

起源: ノカルディア・コラリーナ B-276 (FERM BP-5124; ATCC 31338)

910-1935 amino A

1935-2285 amino B

2300-3802 amino C

3805-4830 amino D

GCA TCC CCA GGT CCC GAG CCA CCG CGG CGA TCG ACT TCC CCG TCT 45  
CAT GCA CGA TCC GCA CAG CCC CCT CAC GGA ACT CCG GGT CGT ACT 90  
TTT CCG CTT CTC TGA CAT CCC TAC CCC TTA TAG CTG ATG CCT CCA 135  
CGG TCT CCG GGA ATG CCA ATA TGA CTT GGT CAG ATC GTA GGC GGC 180  
AAG AAC CAT GGC TTC CTT GGC GGA CTT CAC AGG GGC CTC TCC TCG 225  
AGG GCT CGT TCG GGC ATG GGT AGC ACC GTC GAG CGA ACC CGA GGA 270  
GAG GGC CCG ATC CCG GGA GGC GAT CCG GAT GAA CCG GGA CGT GTC 315  
GAG AAT CGA TCA GAC TTG GTG GGC AGA TTC GTG TCC GCC GGT GCG 360

CAG AAC CCG ATG GCC ATC CAC GCG CAC TTT GGT GGC CAT CAG TCG 405  
CGG GTT TCG TGA CCC CCT ATG GGC AGT TTT CCA TCG CCG CCG ACA 450  
CAC AGC CCC GCA CCG ATG AGC AGG TAC TCG ACC ACC CCG CCG ACC 495  
CCG CCG TGG TTT CCT GCA ACA AAT GAC AAC TTG ATC AAC GCA TCG 540  
ATC AGC ACC GGC CCC ACT AAC GGC GGC CCG GCA AGC ATC GAC ATC 585  
AAC ACC ATC CCG ACC GTC CCG CCT TCA CAT CGA CGA CAC CTC GGT 630  
CGA TGT GTG CAT ACC GCA TGC ATC CCG CAA GAA CCG CCG GGA CTC 675  
GCC AGC CCG TCG GGC TAG CCG ATT TCA CCC AAC CTG GGA CGT TCG 720  
CTA CCG AAC GTC TCG TCG ATG ACC GCG CCT GCA TCG TCG ATA GAC 765  
CGG TCC GTG GGC GCA ATG TCG TCG TGA GGC ATG CGA CCG GCT TCG 810  
ATT CCT CTC GGC GCG GGC AAC ACC GCG GCG CCG GCG CTG TCT AAC 855  
ATC GCG GCA CAA GGA AAT CCG AAC CCG ACC GAA AGC ATG GAA GGC 900

(10)

特開平8-70881

17

18

GTA GCG ATG ACG ACA CAG GCG ACG GTG GCG CGA CCG GTG GAG CTC 945  
 (amoA) Thr Thr Glu Ala Thr Val Ala Arg Pro Val Glu Leu  
 GAA GGT CAC CCG ACA TTC ACC TGG TTC ACG GCG GCG ACG CGA AAG 990  
 Glu Gly His Arg Thr Phe Thr Trp Phe Thr Pro Ala Arg Arg Lys

GCG ACG GAG TAC GAG CTC TAC ACC GTG GGT CAA CAG TCC ACT CCG 1035  
 Pro Thr Glu Tyr Glu Leu Tyr Thr Val Gly Gln Gln Ser Thr Pro  
 GAC GAG TGG CTG CAT GTG GAC TGG CCG CTG GCG TTC GAC GAC GCG 1080  
 Asp Glu Trp Leu His Val Asp Trp Pro Leu Arg Phe Asp Asp Gly  
 GCG GCG CCG TGG CAG GAG GAG TGG AGT GCG GTA CCG ACC TCG GAG 1125  
 Arg Ala Pro Trp Glu Glu Glu Ser Ser Ala Val Arg Thr Ser Glu  
 TGG TGG GCT TAC CCG GAC CCA CAC CAA CTG TGG CAG GGT CCC TAC 1170  
 Trp Ser Ala Tyr Arg Asp Pro His Gln Leu Trp Gln Arg Pro Tyr  
 GTC ACG ACG TCG AAC CAG GAC CAG CAG GCG CTC GCG CCG CTG GTC 1215  
 Val Ser Thr Cys Asn Gln Asp Gln Gln Ala Leu Ala Arg Leu Val  
 GCG GTC CTG ACC ATG GCG TCG GCG GCG ATC ACG CCG ATC TGG TCG 1260  
 Pro Val Leu Thr Met Gly Ser Ala Ala Ile Thr Pro Ile Trp Ser  
 CAG AAG ATC CTC GCG ACG TCC TAC GCG GCG TGG CCA TTC GTC GAG 1305  
 Gln Lys Ile Leu Ala Arg Ser Tyr Ala Ala Trp Pro Phe Val Glu  
 TAC GCG CTC TTC CTG ACG CTG GCG TAC GCG GTG GCG CAG GCG ATG 1350  
 Tyr Gly Leu Phe Leu Ser Leu Ala Tyr Ala Val Arg Gln Ala Met  
 TCC GAC ACG GTC CAG TTC ACG GTG GTG TTC CAG GCG GTG GAC GCG 1395  
 Ser Asp Thr Val Gln Phe Ser Val Val Phe Gln Ala Val Asp Arg  
 ATG GCG CTG CTC CAG GAC ATC GTC CAC CAC CTG GAC CAC CTG CAG 1440  
 Met Arg Leu Leu Gln Asp Ile Val His His Leu Asp His Leu Gln  
 GAG TGG CCG GAA TTC ACG GAC GCG GCG GCG GCG GAG GCG TGG ATG 1485  
 Glu Ser Pro Glu Phe Ser Asp Ala Gly Ala Arg Glu Ala Trp Met  
 TCC GAC TCC ACC CTG GTC CCG ATC CCG GAA GTG ATC GAG CCG ATC 1530  
 Ser Asp Ser Thr Leu Val Pro Ile Arg Glu Val Ile Glu Arg Ile  
 GCG GCG ACG CAG GAC TGG GTG GAG ATC CTG GTC GCG GCG ACG CTC 1575  
 Ala Ala Ser Gln Asp Trp Val Glu Ile Leu Val Ala Gly Thr Leu  
 GTC TTC GAG CCT CTG GTC GCG CAC CTG CCG AAG GCG CAG TTG TTC 1620  
 Val Phe Glu Pro Leu Val Gly His Leu Ala Lys Ala Glu Leu Phe  
 ACG CCG CGT CCG CCA ATG TTC GCG GAC GCG ACC CCG CCG CCG GTG 1665  
 Ser Arg Arg Ala Pro Met Phe Gly Asp Gly Thr Thr Pro Ala Val  
 CTG GCG TCG CCG CTG CTG GAC ACG GCG ACG CAC CTC GAA TCG GTC 1710  
 Leu Ala Ser Ala Leu Leu Asp Ser Gly Arg His Leu Glu Ser Val  
 CAG GCG CTC GTC CCG CTC GTC TCC CAA GAC GCG GTC CAT GCG GAC 1755  
 Gln Ala Leu Val Arg Leu Val Cys Gln Asp Pro Val His Gly Asp  
 CAG AAC CAG GCG ACT GTG CCG CCG TGG ATC CAG GAA TGG CAG CCG 1800  
 Gln Asn Gln Ala Thr Val Arg Arg Trp Ile Glu Glu Trp Gln Pro  
 GCG TCC AAG CCG CCG GCG CAG TCC TTC CTG CCG ACG TTC TCC GAC 1845  
 Arg Cys Lys Ala Ala Ala Gln Ser Phe Leu Pro Thr Phe Ser Asp

TCC GCG ATC GAC GCG AAG GAA ACC GCG AAC CCG CTG TCC CCG CCG 1890  
 Cys Gly Ile Asp Ala Lys Glu Ser Ala Asn Ala Leu Ser Arg Ala  
 CTG GCG AAC CAG CCG GCG GCG GTC GAG GCG GCG GCG ATC ACG CCA 1935  
 Leu Ala Asn Gln Arg Ala Ala Val Glu Gly Ala Gly Ile Thr Ala

(amoB)M

TG ACA GAC GTT AAG GAG ACC ACT GTG ACC ACC ACC CCG TCG GCG 1979

(11)

特開平8-70881

19

20

et Thr Asp Val Lys Glu Thr Thr Val Thr Ser Thr Pro Ser Ala  
 GCC GTG CCG GGA ACC AAG AAC CCG CCG GTT GGT ATC TCG CTG ATC 2024  
 Ala Val Pro Gly Thr Lys Asn Arg Arg Val Gly Ile Ser Leu Ile  
 ACC ACC ACC GAC ACC CAG GCA GCT GTC GAG CAC ATC CCG GAG ACC 2069  
 Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ala Ala Val Glu His Ile Ala Glu Thr  
 CAG CCG GAC CCG AAG ATC GAC TTT CCG GAC TCC TTC TAC AAG ATC 2114  
 Gln Pro Asp Ala Lys Ile Asp Phe Arg Asp Cys Phe Tyr Lys Ile  
 GAG CGT GAC CCG CAG CTC AGT TTC GAC ATG GCA GAG CTC AGT GAG 2159  
 Glu Arg Asp Gly Gln Leu Ser Phe Asp Met Ala Glu Leu Ser Glu  
 ATC GCC GGT CCG GAC ATC GAC ACC GAC ATC TTC CTG GTG AAC ATG 2204  
 Ile Ala Gly Arg Asp Ile Asp Thr Asp Ile Phe Leu Val Asn Met  
 ACC ACC TAC TAC CCG CCG ATC GTC GTC AGT GAC CCG CCG GTC GAC 2249  
 Ser Thr Tyr Tyr Gly Arg Ile Val Val Ser Asp Gly Arg Val Asp

ATC TAC GCC GAA ATC CAG CCG GCC CCG TTC AAG GAC TGA GAG GAA 2294  
 Ile Tyr Ala Glu Ile Gln Pro Ala Arg Phe Lys Asp \*  
 ACA CC ATG GCA TCG AAC CCC ACC CAG CTC CAC GAG AAG TCG AAG 2338  
 (amoc) Met Ala Ser Asn Pro Thr Gln Leu His Glu Lys Ser Lys  
 TCC TAC GAC TGG GAC TTC ACC TCC GTC GAG CCG CCG CCC AAG TTC 2383  
 Ser Tyr Asp Trp Asp Phe Thr Ser Val Glu Arg Arg Pro Lys Phe  
 GAG ACC AAG TAC AAG ATG CCG AAG AAG CCG AAG GAC CCG TTC CCG 2428  
 Glu Thr Lys Tyr Lys Met Pro Lys Lys Gly Lys Asp Pro Phe Arg  
 GTC CTG ATC CGT GAC TAC ATG AAG ATG GAA CCG GAG AAG GAC GAC 2473  
 Val Leu Ile Arg Asp Tyr Met Lys Phe Glu Ala Glu Lys Asp Asp  
 CCG ACC CAT CCG TTC CTC GAC GCG CCG GTG CCG ACC CGT GAG CCG 2518  
 Arg Thr His Gly Phe Leu Asp Gly Ala Val Arg Thr Arg Glu Ala  
 ACC ACC ATT GAG CCG CCG TTC GCT GAG CCG ATG AAG ATC ATG GTG 2563  
 Thr Arg Ile Glu Pro Arg Phe Ala Glu Ala Met Lys Ile Met Val  
 CCG CAG CTG ACC AAC CCG GAG TAC CAG CCG GTG CCG CCG TCC GGA 2608  
 Pro Gln Leu Thr Asn Ala Glu Tyr Gln Ala Val Ala Gly Cys Gly  
 ATG ATC ATC TCG CCG GTC GAG AAC CAG GAG CTC CGT CAG CCG TAC 2653  
 Met Ile Ile Ser Ala Val Glu Asn Gln Glu Leu Arg Gln Gly Tyr  
 CCG CCT CAG ATG CTC GAT GAG GTG CCG CAC CCG CAG CTC GAG ATG 2698  
 Ala Ala Gln Met Leu Asp Glu Val Arg His Ala Gln Leu Glu Met

ACG CTA CCG AAC TAC TAC CCG AAG CAC TCG TCC GAT CCC TCC CCG 2743  
 Thr Leu Arg Asn Tyr Tyr Ala Lys His Trp Cys Asp Pro Ser Gly  
 TTC GAC ATC GGT CAG CCG CCG CTG TAC CAG CAC CCG CCG CCG CTG 2788  
 Phe Asp Ile Gly Gln Arg Gly Leu Tyr Gln His Pro Ala Gly Leu  
 GTG TCC ATC CCG GAG TTC CAG CAC TTC AAT ACT GGT GAC CCG CTT 2833  
 Val Ser Ile Gly Glu Phe Gln His Phe Asn Thr Gly Asp Pro Leu  
 GAC GTC ATC ATC CAT CTC AAC ATC GTG CCG CAG ACC CCG TTC ACC 2878  
 Asp Val Ile Ile Asp Leu Asn Ile Val Ala Glu Thr Ala Phe Thr  
 AAC ATC CTG CTG CCG ACT CCA CAG GTC CCG GTG CCG AAC CCG 2923  
 Asn Ile Leu Leu Val Ala Thr Pro Gln Val Ala Val Ala Asn Gly  
 CAC AAC CCG ATG CCG ACC GTG TTC CTC TCG ATC CAG TCG GAC GAG 2968  
 Asp Asn Ala Met Ala Ser Val Phe Leu Ser Ile Gln Ser Asp Glu  
 CCG ACC CAC ATG CCG AAC CCG TAC CCG TCG GTC ATG CCG CTG CTG 3013  
 Ala Arg His Met Ala Asn Gly Tyr Gly Ser Val Met Ala Leu Leu

(11)

特開平8-70881

19

20

et Thr Asp Val Lys Glu Thr Thr Val Thr Ser Thr Pro Ser Ala  
 GCC GTG CCG GGA ACC AAG AAC CGC CGC GTT GGT ATC TCG CTG ATC 2024  
 Ala Val Pro Gly Thr Lys Asn Arg Arg Val Gly Ile Ser Leu Ile  
 ACC ACC ACC GAC ACC GAG GCA GCT GTC GAG CAC ATC CCG GAG ACC 2069  
 Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ala Ala Val Glu His Ile Ala Glu Thr  
 CAG CCG GAC CCG AAG ATC GAC TTT CCG GAC TGC TTC TAC AAG ATC 2114  
 Gln Pro Asp Ala Lys Ile Asp Phe Arg Asp Cys Phe Tyr Lys Ile  
 GAG CGT GAC CCG CAG CTC AGT TTC GAC ATG GCA GAG CTC AGT GAG 2159  
 Glu Arg Asp Gly Gln Leu Ser Phe Asp Met Ala Glu Leu Ser Glu  
 ATC GCC CGT CCG GAC ATC GAC ACC GAC ATC TTC CTG GTC AAC ATG 2204  
 Ile Ala Gly Arg Asp Ile Asp Thr Asp Ile Phe Leu Val Asn Met  
 ACC ACC TAC TAC CCG CCG ATC GTC GTC AGT GAC CCG CCG GTC GAC 2249  
 Ser Thr Tyr Tyr Gly Arg Ile Val Val Ser Asp Gly Arg Val Asp

ATC TAC GCC GAA ATC CAG CCG GCC CCG TTC AAG GAC TGA GAG GAA 2294  
 Ile Tyr Ala Glu Ile Gln Pro Ala Arg Phe Lys Asp \*  
 ACA CC ATG GCA TCG AAC CCC ACC CAG CTC CAC GAG AAG TCG AAG 2338  
 (amoc) Met Ala Ser Asn Pro Thr Gln Leu His Glu Lys Ser Lys  
 TCC TAC GAC TCG GAC TTC ACC TCC GTC GAG CCG CCG CCC AAG TTC 2383  
 Ser Tyr Asp Trp Asp Phe Thr Ser Val Glu Arg Arg Pro Lys Phe  
 GAG ACC AAG TAC AAG ATG CCC AAG AAG CCC AAG GAC CCG TTC CCG 2428  
 Glu Thr Lys Tyr Lys Met Pro Lys Lys Gly Lys Asp Pro Phe Arg  
 GTC CTG ATC CGT GAC TAC ATG AAG ATG GAA CCG GAG AAG GAC GAC 2473  
 Val Leu Ile Arg Asp Tyr Met Lys Phe Glu Ala Glu Lys Asp Asp  
 CCG ACC CAT CCG TTC CTC GAC GCC CCG GTG CCG ACC CGT GAG CCG 2518  
 Arg Thr His Gly Phe Leu Asp Gly Ala Val Arg Thr Arg Glu Ala  
 ACC ACC ATT GAG CCG CCG TTC GCT GAG GCC ATG AAG ATC ATG GTG 2563  
 Thr Arg Ile Glu Pro Arg Phe Ala Glu Ala Met Lys Ile Met Val  
 CCG CAG CTG ACC AAC CCG GAG TAC CAG CCG GTG CCG CCG TCG GGA 2608  
 Pro Gln Leu Thr Asn Ala Glu Tyr Gln Ala Val Ala Gly Cys Gly  
 ATG ATC ATC TCG CCG GTC GAG AAC CAG GAG CTC CGT CAG CCG TAC 2653  
 Met Ile Ile Ser Ala Val Glu Asn Gln Glu Leu Arg Gln Gly Tyr  
 CCG GCT CAG ATG CTC GAT GAG GTG CCG CAC CCG CAG CTC GAG ATG 2698  
 Ala Ala Gln Met Leu Asp Glu Val Arg His Ala Gln Leu Glu Met

ACG CTA CCG AAC TAC TAC CCG AAG CAC TCG TCG GAT CCC TCC CCG 2743  
 Thr Leu Arg Asn Tyr Tyr Ala Lys His Trp Cys Asp Pro Ser Gly  
 TTC GAC ATC CGT CAG CCG CCG CTG TAC CAG CAC CCG CCG CCG CTG 2788  
 Phe Asp Ile Gly Gln Arg Gly Leu Tyr Gln His Pro Ala Gly Leu  
 GTG TCG ATC CCG CAG TTC CAG CAC TTC AAT ACT GGT GAC CCG CTT 2833  
 Val Ser Ile Gly Glu Phe Gln His Phe Asn Thr Gly Asp Pro Leu  
 GAC GTC ATC ATC CAT CTC AAC ATC GTG CCG CAG ACC CCG TTC ACC 2878  
 Asp Val Ile Ile Asp Leu Asn Ile Val Ala Glu Thr Ala Phe Thr  
 AAC ATC CTG CTG GCG CCG ACT CCA CAG GTC CCG GTG CCG AAC CCG 2923  
 Asn Ile Leu Leu Val Ala Thr Pro Gln Val Ala Val Ala Asn Gly  
 GAC AAC CCG ATG CCG ACC GTG TTC CTC TCG ATC CAG TCG GAC GAG 2968  
 Asp Asn Ala Met Ala Ser Val Phe Leu Ser Ile Gln Ser Asp Glu  
 CCG ACC CAC ATG CCG AAC CCG TAC CCG TCG GTC ATG CCG CTG CTG 3013  
 Ala Arg His Met Ala Asn Gly Tyr Gly Ser Val Met Ala Leu Leu

(13)

特開平8-70881

23

24

TTC TTC TCG GGC GAC ACC TCG GCG GAG TTC CAG ACC CTC GTG GCG 4137  
 Phe Phe Ser Gly Asp Thr Ser Arg Glu Phe Gln Thr Val Val Gly  
 GGT GTC GAG TTT CTC ACC GCG GAC ATC GCC GCG GTC GCG CTC GCG 4182  
 Gly Val Glu Phe Leu Thr Ala Asp Ile Ala Arg Val Arg Leu Arg  
 CTA GAG CCG GCG GAG GAG ATC GCC TTC ACC GCG GGT CAG TTC GTC 4227  
 Leu Glu Pro Gly Glu Glu Ile Ala Phe Thr Ala Gly Gln Phe Val  
 AAC GTC GAG GTG CCG GCG ACC GGT CTG CTG GCG ACC TTC TCG CTG 4272  
 Asn Val Glu Val Pro Gly Thr Gly Leu Leu Arg Thr Phe Ser Leu  
 GCA AAC GCC CCT GAC GAC CCG TCA GTG GTG CAG CTG ATC TGC AAG 4317  
 Ala Asn Ala Pro Asp Asp Pro Ser Val Val Glu Leu Ile Cys Lys  
 CTC TAC CCG GAT GCG CTC TTC TCC GCG TTC CTG ACC GAC GAG GCT 4362  
 Leu Tyr Pro Asp Gly Leu Phe Ser Arg Phe Leu Arg Asp Glu Ala  
 GCG CCG GCG ACC CCG GTC CCG GTG TTC GCG GCG TAT GGT CAG CTC 4407  
 Ala Pro Gly Thr Pro Val Arg Val Phe Gly Pro Tyr Gly Gln Leu

AAG ATC CCG TTG TCC CAC CCG CCG ATC CTG ATG ATC GCC GGT GCG 4452  
 Lys Ile Arg Leu Ser His Arg Pro Ile Leu Met Ile Ala Gly Gly  
 TCC GGT CTC GCG CCG CTG CTC TCG ATG CTG GCA GAC TTG GCC GCG 4497  
 Ser Gly Leu Ala Pro Leu Leu Ser Met Leu Arg Asp Leu Ala Ala  
 AAG AAG TGC GAC CCG CCG GTC TCG ATG TTC TTC GCG GCA CCG ACC 4542  
 Lys Lys Cys Asp Arg Pro Val Ser Met Phe Phe Gly Ala Arg Ser  
 GTC GAC GAC CTG TAC CTC ATC GAG GAG ATC CCG GAG ATC GCG GAG 4587  
 Val Asp Asp Leu Tyr Leu Ile Glu Glu Ile Arg Glu Ile Gly Glu  
 TCG CTA GCC GAT TTC GAG TTC ATC CCG GTG CTC TCG GAG TCG TCG 4632  
 Ser Leu Ala Asp Phe Glu Phe Ile Pro Val Leu Ser Glu Ser Ser  
 GCA GCC GAC TCG CAC GCG GAG ACC GCG ATG GTC ACC GAC CCG TTG 4677  
 Pro Ala Asp Trp His Gly Glu Thr Gly Met Val Thr Asp Ala Leu  
 CTG CCG TGG CCG GCG GAA CTG CCG CAT GAC GTC TAC CTG TCG GCG 4722  
 Leu Arg Trp Arg Ala Glu Leu Ala His Asp Val Tyr Leu Cys Gly  
 GCG CCA CCG ATG ATC GAC CCG GCT GTG CCG CTG CTC GTC GAG CCG 4767  
 Pro Pro Pro Met Ile Asp Ala Ala Val Pro Leu Leu Val Glu Arg  
 GCG GTG CCG CCA CCG AAC ATC TAC TAC GAC CCA TTC ACC CCA GCT 4812  
 Gly Val Arg Pro Arg Asn Ile Tyr Tyr Asp Ala Phe Thr Pro Ala  
 GCT CAG GTA GTC GTC GTC TGA TCG TCG ATA TCC GAT TCG CCG GCG 4857  
 Ala Gln Val Val Val Val \*

GGT ACC GCG GCG GTT ACC GCA GCG TAA TCG GCG GCG ATA GAG GCA 4902  
 GCG ACC AGA GAT GAT CCG CGT GCA AAG CGA ACC TTC GAC TCA GTT 4947  
 GAC ACC TTC GCG AAT GTG CTG TCG GAG CAC CAT AAC CGT GTG TTA 4992  
 GCG GTG ACC CTC AAT CCG ACC GGT GCG CTG ACC GCA ATC AAT TCA 5037  
 GCT ATG GCT GAT CAA TTG CCG GAA CCG TCG GTG TCG GTG CCG ACC 5082  
 CAA ACC GGA ATT CAT TCA ATC GTC ATC TCG GCT TCG CCG CCG GAG 5127  
 TCG TTT TTG CAT CCG TTT TGA TCC GCG CGA GCG GCG GCA GCG GAT 5172  
 GTT CCA TCG CCG CAT CAG CCG GAA GCA ATG CCG CGT CCA TCA ACC 5217  
 GGT CAT AGT CCG GGT GAA CCG CAT CCG GTG CCG CAT CCT GAG CCG 5262  
 CCG CGA ACC GAC ACT CCG TAA CCG GGT GAC CCG GCA ACA CCG CAT 5307  
 GCA GTC CCG CTT GGT TCG GCA GGT CGT ACC GCT TCG ATC CCG TCG 5352  
 GTT GTC GAG CGA ATA GCT CAG CCG GCA GCA CAT CGT ATA CCG ATT 5397  
 CAG GTG GGT AGT TGA TCT TCG CCG TGT CGA TGT GTG ACC CCG CCG 5442  
 ATC TCG CCG ACC AAC AAC ATC ACC AAG CGT GAC CTT CCG CCG ACA 5487

(14)

特開平8-70881

25

26

ACA TCG TGC CGT CCG GGA CCG GTG CCG ACC GTG ATC TCG GCG AAG 5532  
 TCC TGC CCG AGT TCG CCG GGC GGT TCC ACA CCG TTG GCG GTC CCT 5577  
 CCG CTA CAC CTC GGC GCT GTT CGT CAG CTC GGA CAT CAT CCG TCA 5622  
 CCG ACA CTC CTG CCC GGT GTT CCG CAA CAT GGT GCA CGA CCG GCA 5667  
 GGT GAA CCT TCG GCT GGT ACC ACA CCG AAT GCG CGA TCG CAA TCC 5712  
 GTT GCT CGA CCT GGT GCG GGT CAT GCG TGG GGT TCG CTG ACT ACC 5757  
 CCG CCT GTT CGT GCG GCG CCG AAC ATC CAG CCG GTG AGG AGT TCG 5802  
 GTA CCG GTC CCG CAG AAA CTC CAC GAC CCG GCG AAC CTC GTC CCG 5847  
 CTC ACC GAG TCG CCG CAC TCG GAT CTT GCG GAT GAC CCG ATC GAG 5892  
 CCG CTC CTT GCG CAC GCG ACC AAC TAT CTC GGT GGA GAT GTA GCG 5937  
 AGG CCG AAC GGA ATT CAC GGT GAT GCG CTT GCG GCG GGT CTC CTG 5982  
 GCG CAG GGT CTG TGT GCT TAT CTC TTG TCG ACC GAA CAC GGT GTG 6027  
 CCG TCG AGT TCG TCG GTT TGA TCA CCG CCG AAC CCG GAA TAG CAG 6072  
 GCG TTC GCG CTG ACC GCG GCG GCG GCA CAG CCG GCG CCG CCG GAC 6117  
 CCG GCG CCG CCG GCG GCG CAG CTC GAG CAC GAG ATG CAG CCG GAT 6162

CGG GCG CCG GGA GCG GCG GAC CCG GTG CCG CAT GCG GAT CCG GCG 6207  
 GCG GTT GAC GTT GAC GTT GTC CCG CCG GAT CTG CAG GTC CCG CAT 6252  
 GGA TTG AAT ACC GAC CCG CCG GAA TCG CTC GTT GAT CTC GTA CAG 6297  
 GTC CAC ATC CAT GCG GGA GAG TCC TTC CCG CCG CAG CCG CCT GCG 6342  
 GAT CCG GTT GGA CCG TTG CGA CAG CAG CGA CCG ATC C 6379

【図面の簡単な説明】

【図1】 *E. coli* (大腸菌) JM109 (pDBB-1) 株 (FERM BP-4250) に保持されているプラスミドベクター pDBB1 の制限酵素地図及び *amoABC* 遺伝子の組込み部位を示す。

【図2】 添加するトリクロロエチレンの量 (液相濃度初期値) を種々に採り、*Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124; ATCC 31338) を作用させた際、液相に残存するトリクロロエチレン濃度の経時変化を比較する。

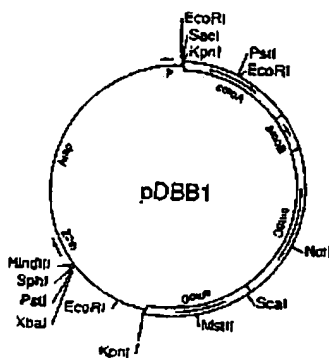
【図3】 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) \*

\* ナ) B-276 株 (FERM BP-5124; ATCC 31338) によるトリクロロエチレン処理速度のトリクロロエチレン添加量依存性を示す。

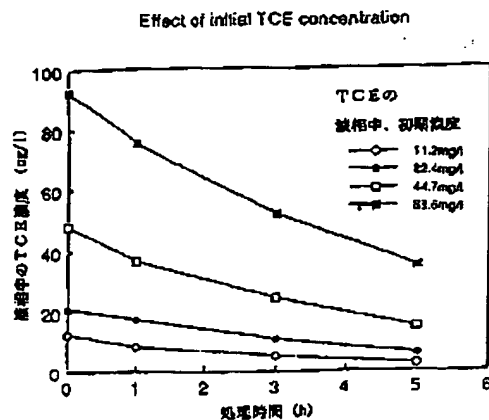
【図4】 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124; ATCC 31338) によるトリクロロエチレン処理速度の温度依存性を示す。

【図5】 *Nocardia corallina* (ノカルディア コラリーナ) B-276 株 (FERM BP-5124; ATCC 31338) による処理における、各基質の残存量の経時的な変化を比較する。

【図1】



【図2】

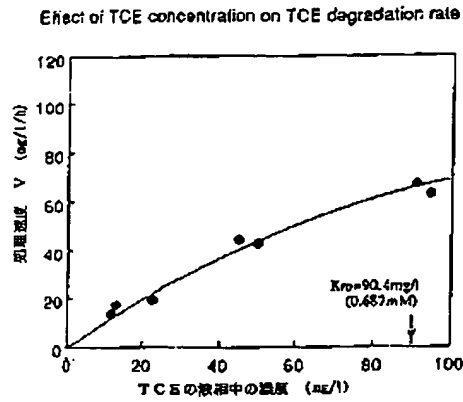




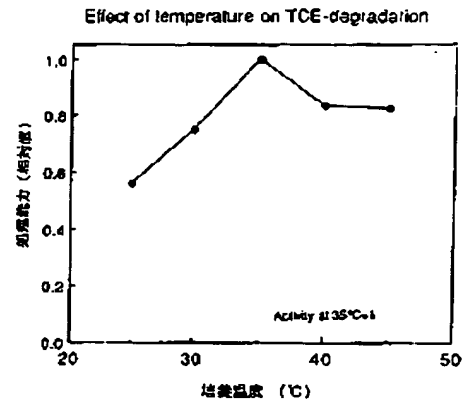
(15)

特開平8-70881

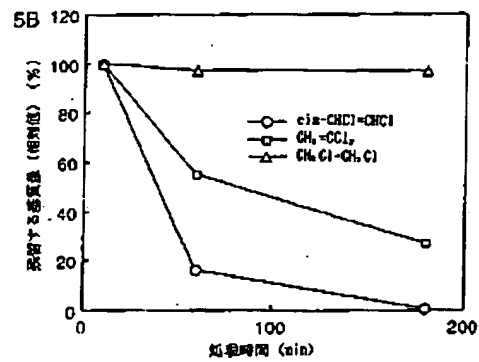
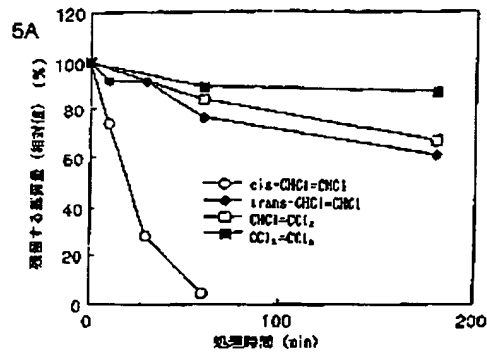
【図3】



【図4】



【図5】



(16)

特開平 8 - 7 0 8 8 1

フロントページの続き

(51)Int.Cl.\*

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

/(C 1 2 P 17/02

C 1 2 R 1:365)

(C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:365)

C 1 2 R 1:365)